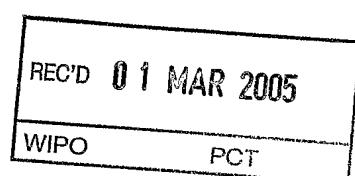




별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

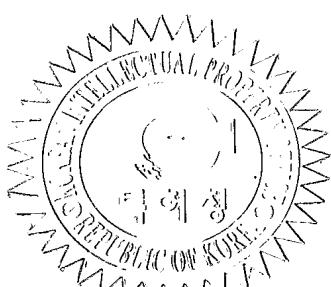
출 원 번 호 : 10-2004-0006186
Application Number



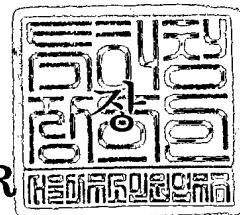
출 원 년 월 일 : 2004년 01월 30일
Date of Application JAN 30, 2004

출 원 인 : 주식회사 라이프엔자
Applicant(s) LIFENZA CO., LTD.

2005 년 01 월 12 일



특 허 청
COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	출원인 변경 신고서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.07.13
【구명의인(양도인)】	
【성명】	김도만
【출원인코드】	4-1998-045445-7
【사건과의 관계】	출원인
【신명의인(양수인)】	
【명칭】	주식회사 라이프엔자
【출원인코드】	1-2000-028875-1
【대리인】	
【명칭】	특허법인씨엔에스
【대리인코드】	9-2003-100065-1
【지정된변리사】	손원, 염승윤
【포괄위임등록번호】	2003-045937-3
【포괄위임등록번호】	2004-048046-1
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2004-0006185
【출원일자】	2004.01.30
【심사청구일자】	2004.01.30
【발명의 명칭】	뮤텐, 이눌린 및 레반을 분해하는 단백질, 그 단백질을 코딩하는 유전자, 그 발현 세포 및 상기 단백질의 생산 방법
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2004-0006186
【출원일자】	2004.01.30
【심사청구일자】	2004.01.30
【발명의 명칭】	아밀로펙틴, 전분, 글리코겐 및 아밀로즈 분해활성을 갖는 단백질, 그 단백질을 코딩하는 유전자, 그 발현 세포 및 상기 단백질의 생산방법
【변경원인】	전부양도

【취지】

특허법 제38조제4항·실용신안법 제20조·의장법 제24조 및 상표법 제12조 제1항의 규정에 의하여 위와
같이 신고합니다. 대리인
특허법인씨엔에스 (인)

【수수료】

26,000 원

【첨부서류】

1. 양도증_2통 2. 인감증명서_1통

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0003
【제출일자】	2004.01.30
【국제특허분류】	C12N 1/16
【발명의 명칭】	아밀로펙틴, 전분, 글리코겐 및 아밀로즈 분해활성을 갖는 단백질, 그 단백질을 코딩하는 유전자, 그 발현 세포 및 상기 단백질의 생산 방법
【발명의 영문명칭】	Protein with the hydrolysis of amylopectin, starch, glycogen and amylose, gene encoding said protein, the expressing host cell and methods for producing said protein
【출원인】	
【성명】	김도만
【출원인코드】	4-1998-045445-7
【대리인】	
【명칭】	특허법인씨엔에스
【대리인코드】	9-2003-100065-1
【지정된변리사】	손원, 염승윤
【포괄위임등록번호】	2003-045937-3
【발명자】	
【성명】	김도만
【출원인코드】	4-1998-045445-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	강희경
【성명의 영문표기】	KANG, Hee Kyoung
【주민등록번호】	740129-2932346
【우편번호】	506-010
【주소】	광주광역시 광산구 송정동 라인2차아파트 105동 803호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이진하
【성명의 영문표기】	LEE, Jin Ha

【주민등록번호】 730521-2559913
【우편번호】 502-801
【주소】 광주광역시 서구 광천동 576-10번지
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【미생물기탁】
【기탁기관명】 한국 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행
【수탁번호】 KCTC 10573BP
【수탁일자】 2003.12.24
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 4
【서열목록의 전자파일】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
특허법인씨엔에스 (인)
【수수료】
【기본출원료】 35 면 38,000 원
【가산출원료】 0 면 0 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 10 항 429,000 원
【합계】 467,000 원
【감면사유】 개인 (70%감면)
【감면후 수수료】 140,100 원
【첨부서류】 1. 미생물기탁증명서_1통



040006186

출력 일자: 2005/1/13

【요약서】

【요약】

본 발명은 아밀로펙틴, 전분, 글리코겐 및 아밀로즈 분해활성을 갖는 효소에 관한 것으로, 아밀로펙틴, 전분, 글리코겐 및 아밀로즈 분해활성을 갖는 서열 목록 1의 아미노산을 포함하는 단백질, 이의 변이체, 또는 이들의 단편, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 발현하는 형질전환된 세포를 제공한다. 또한 본 발명은 상기의 세포를 배양하는 단계, 상기 배양된 세포에서 효소를 발현하는 단계 및 발현된 효소를 정제하는 단계를 포함하는 아밀로펙틴, 전분, 글리코겐 및 아밀로즈 분해활성을 갖는 효소의 생산 방법과 상기의 방법에 의해 생산된 효소 및 그 효소를 포함하는 조성물을 제공한다.

본 발명에 의해 제공되는 효소는 치태제거나 구강세정용으로 유용하며 또한 텍스트란 분해능을 가져 설탕 제조시 텍스트란 제거용 혹은 설탕 제조공정중 오염되는 다당의 제거에 활용될 수 있다.

【대표도】

도 1a

【색인어】

리포마이세스 스타케이, 아밀로펙틴, 전분, 글리코겐, 아밀로즈, 텍스트란



040006186

출력 일자: 2005/1/13

【명세서】

【발명의 명칭】

아밀로펙틴, 전분, 글리코겐 및 아밀로즈 분해활성을 갖는 단백질, 그 단백질을 코딩하는 유전자, 그 발현 세포 및 상기 단백질의 생산 방법{Protein with the hydrolysis of amylopectin, starch, glycogen and amylose, gene encoding said protein, the expressing host cell and methods for producing said protein}

【도면의 간단한 설명】

도 1a, b은 리포마이세스 스타케이(*Lipomyces starkeyi*)에서 분리한 본원발명의 탄수화물 가수분해효소(LSA)의 아미노산 서열 및, 이를 코딩하는 1946 bp의 cDNA 단편의 염기서열이다(이중 밑줄친 곳은 성숙 단백질의 N-말단의 아미노산 서열분석을 통해 분석된 백터에 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 부분이며, 화살표로 표시된 부분은 신호 펩타이드 절단 부위이며, 그리고 굵은 글씨체 및 밑줄이 동시에 표시된 부분은 α -아밀라아제의 보존부위임).

도 2는 본원발명의 탄수화물 가수 분해 효소(LSA)의 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석 결과이다(레인 1: 끓인 효소, 레인 2: 끓이지 않은 효소, 레인 3: 끓인 효소를 이용한 웨스턴 블롯 분석(이때 사용한 항체는 항-카보하이드로라아제-항체임)).

도 3은 본원발명의 탄수화물 가수 분해 효소(LSA)의 전기영동에 의한 분리, 활성염색 및 면역검출 분석 결과이다(M:분자량 마커, 레인 1: 분리 정제된 효소의 쿠마시 블루 염색, 레인 2: 분리 정제된 효소의 활성염색, 레인 3: 모균의 LSA 효소에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석, 화살표는 LSA 밴드를 가리킴).

도 4는 본원발명의 탄수화물 가수 분해 효소(LSA)의 활성 및 안정성에 대한 온도의 영향을 나타낸 것이다.

도 5는 본원발명의 탄수화물 가수 분해 효소(LSA)의 활성 및 안정성에 대한 pH의 영향을 나타낸 것이다.

도 6은 아세톤이 본원발명의 탄수화물 가수 분해 효소(LSA)의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과이다.

도 7은 에탄올이 본원발명의 탄수화물 가수 분해 효소(LSA)의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과이다.

도 8은 본원발명의 탄수화물 가수 분해 효소(LSA)를 사용하여 전분과 말토올리고당을 가수분해한 TLC 결과를 나타낸 것이다((A) 전분(1%w/v)으로부터의 산물, Mn은 일련의 말토덱스트린을 표시하며, 레인 1과 2는 정제된 LSA에 의해 전분 분해 전과 후를 표시함. (B) 정제된 LSA 와 반응한 G1(글루코즈)에서 G7(말토헵토즈)(1%w/v)까지의 말토올리고당(레인 1-7)).

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<9> 본 발명은 아밀로펙틴, 전분, 글리코겐 및 아밀로즈 분해활성을 갖는

단백질, 그 단백질을 코딩하는 유전자, 그 발현 세포 및 상기 단백질의 생산 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게 본 발명은 플라크 형성 억제능과 플라크 분해능을 가져 치태제거나 구강세정용으로 유용하며 또한 우수한 텍스트란 분해능을 가져 설탕 제조시 텍스트란 제거용으로도 유용한 효소, 그 효소를 코딩하는 유전자, 그 발현 세포 및 상기 효소의 생산 방법에 관한 것이다.

<10> 일반적으로 치아 표면에 형성되는 막(플라크)은 치밀하게 팩킹된 세균과 비 세포성 물질로 이루어진다. 플라크의 주요 다당 성분은 물에 녹지 않는 글루칸(불용성 글루칸) 또는 뮤坦(mutan)으로, 플라크 건조총량의 약 20%를 차지하며, 충치를 유발시키는 주요 원인 중 하나이다. 스트렙토코커스 뮤坦스(*Streptococcus mutans*)에 의해 생산되는 글루칸의 구조 연구를 통해 불용성 글루칸은 주로 알파-1,3, 알파-1,4, 알파-1,6-D-글루코사이드 결합으로 이루어진다는 것이 보고되었다. 따라서 플라크를 효과적으로 제거하기 위해서는 뮤坦 분해 활성, 전분분해 활성 및 텍스트란 분해활성이 필요하다.

<11> 종래에는 플라크 형성이나 충치를 억제하기 위한 방법으로 스트렙토코커스 뮤坦스(*Streptococcus mutans*)(이하, *S. mutans*)의 성장을 억제하는 방법이 제시되었으며, 이를 위하여 *S. mutans* 성장을 억제하는 항생물질이나 불소와 같은 화합물을 치약이나 구강세정제와 같은 구강용 제품에 포함시켜 사용하는 것이 제시되었다. 대표적인 항 충치용 화합물로 사용되는 불소는 충치 유발균의 성장을 억제하는 효과는 있으나 매우 낮은 농도에서도 반상치(치아의 에나멜질에 흰 반점이 생기는 현상), 강한 독성과 대기오염등의 부작용이 심하다. 텍스트란네이즈와 같은 효소로도 충치 억제를 시도하고 있으나 그 효과는 아직 불분명하다.

<12> 미국특허 5,741,773에는 항플라크 및 항충치 활성이 있는 글라이코매크로펩타이드를 함유하는 치약 조성물을 제공하고 있다. 그러나, 이 특허는 단지 항충치의 박테리아 공급원의 성장억제에 관한 것이며, 플라크 형성 억제나 이미 형성된 플라크의 분해는 제시하지 못하였다.

<13> 한편 플라크의 형성 억제와 이미 형성된 플라크의 분해를 위하여 다양한 구조의 다당을 분해하는 텍사메이즈 효소를 이용하고자 제안된 연구가 본 발명자에 의해 제안된 바 있다(국내 특허 등록 10-0358376; 미국특허 6,485,953). 상기 특허에는 다양한 다당을 분해하는 효소를 생산하는 미생물(*Lipomyces starkeyi* KFCC-11077)과 그 효소 및 이를 포함하는 조성물에 관한 내용이 기술되어 있다.

<14> 하지만, 플라크 형성을 효과적으로 억제시킬 수 있고, 보다 우수한 플라크 분해효과를 갖는 새로운 효소가 계속 요구되고 있는 실정이다.

<15> 또한 본 발명자들은 상기 특허(국내특허 등록 10-0358376)에서 사용하는 미생물(*Lipomyces starkeyi* KFCC-11077)로부터 얻어진 효소, 즉 텍사메이즈 효소는 우수한 텍스트란 분해능을 가져 설탕 제조시 텍스트란 제거용으로 유용하게 사용될 수 있음을 제시한 바 있다(대한민국 특허출원 10-2001-48442).

<16> 이에 따라 우수한 플라크 형성 억제능과 플라크 분해능을 가지며, 설탕 제조시 텍스트란 제거용으로도 사용될 수 있도록 충분히 우수한 텍스트란 분해능을 나타내는 새로운 효소의 개발이 필요하다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<17> 본 발명은 상기한 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 개발된 것으로서, 본 발명의 목적은 아밀로펙틴, 전분, 글리코겐 및 아밀로즈 등 여러가지 탄수화물 다당을 분해할 수 있는 새로운 효소 및 그 효소를 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.

<18> 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 생산하는 균주를 제공하는 것이다.

<19> 본 발명의 또 다른 목적은 상기의 효소 및 유전자를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

<20> 본 발명의 또 다른 목적은 상기의 효소를 포함하는 산업적으로 유용한 조성물을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<21> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열 목록 1의 아미노산을 포함하는 단백질 또는 그것의 변이체, 이들의 일부로써 아밀로펙틴, 전분, 글리코겐 및 아밀로즈 분해활성을 갖는 효소를 제공한다.

<22> 또한 본 발명은 상기 유전자를 발현하는 형질전환된 세포를 제공한다.

<23> 또한 본 발명은 상기의 세포를 배양하는 단계, 상기 배양된 세포에서 효소를 발현하는 단계 및 발현된 효소를 정제하는 단계를 포함하는 아밀로펙틴, 전분, 글리코겐 및 아밀로즈 분해활성을 갖는 효소 생산 방법과 상기의 방법에 의해 생산된 효소 및 그 효소를 포함하는 조성물을 제공한다.

<24> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.



040006186

출력 일자: 2005/1/13

<25> 본 발명의 탄수화물 가수분해 효소 (혹은 대표적으로 LSA) 유전자를 얻기 위하여, 리포마이세스 스타케이(*L. starkeyi*)를 전분이 포함된 배지에서 배양한 후 얻은 폴리(A)+ RNA를 분리하였고, 여기에서 *L. starkeyi*에서 생산된 정제된 탄수화물 가수분해효소의 N-말단 아미노산 서열을 바탕으로 탄수화물 가수분해효소의 예상되는 보존 부위(conserved region)의 프라이퍼를 제작, PCR을 통해 약 2 kb의 PCR 단편을 얻었다. 이 단편의 서열을 이용하여 5'RACE와 3'RACE를 통하여 완전한 탄수화물 가수 분해 효소 유전자(LSA)를 얻었다. 이 유전자를 다시 PCR을 통하여 벡터인 pRSETB(Invitrogen, 미국)에 클로닝을 실시하였고, *E. coli* BL21(DE)pLysS으로 형질전환(transformation)을 시켜 형질전환체를 얻었다.

<26> 리포마이세스 스타케이(*Lipomyces starkeyi*, 이하, *L. starkeyi*라 함)는 텍스트란을 분해하는 엔도-텍스트라네이즈(EC 3.2.1.11)와 전분을 분해하는 알파-아밀레이즈를 생산한다고 보고되었다. 이 미생물은 식품에 응용되고 있으며 항생물질이나 기타 독성을 생산한다는 보고는 없다.

<27> 몇몇 세균성 텍스트라네이즈를 제외하고는 미생물에 의해 생산되는 텍스트라네이즈는 일반적으로 유도성 효소로 알려져 있다. 본 발명자는 텍스트라네이즈 및 아밀레이즈 모두를 항상 생산하는 *L. starkeyi* ATCC 74054를 보고한 바 있으며(미국특허 5, 229, 277), 이 미생물이 생산하는 효소의 특성을 밝히면서 슈크로오스 및 전분을 사용하여 작은 크기의 텍스트란을 생산하는 것으로 보고하였다. 본 발명자는 *Lipomyces starkeyi* KFCC-11077을 이용하여 텍스트란과 전분을 동시에 분해할 수 있는 텍사메이즈 효소를 생산하는 미생물과, 이 미생물의 효소, 그리고 이 효소를 포함하는 조성물에 관한 특허를 등록하였다 (미국특허 6,485,953(2002.11.26), 국내특허 등록 10-0358376(2002. 10. 11)).

<28> 본 발명의 유전자(*Isa*)로부터 생산되는 효소는 아밀로펩틴, 전분, 글리코겐 및 아밀로즈 분해하는 탄수화물 가수 분해 효소이다. 또한 본 발명에 따른 효소는 이밖에 텍스트란, 알파-시클로텍스트란, 플루란 등을 분해할 수 있는 것으로 확인되었으며, 비교적 광범위한 pH범위 (pH5-8)에서 90%이상의 활성을 유지하며, EGTA와 같은 변성용액에 대해서도 활성이 저해되지 않는 강한 안정성을 나타내며 효소 활성은 Ca^{2+} 또는 Mg^{2+} 등에 의해서 촉진됨을 확인하였다.

<29> 또한 본 발명은 상기 탄수화물 가수 분해 효소를 생산하는 유전자를 가지는 신규한 미생물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 균주 *E. coli* BL21(DE3)pLysS는 2003년 12월 24일자로 대한민국 대전시 유성구에 있는 생명공학 연구소 유전자은행(KCTC)에 기탁하였으며 기탁번호 KCTC10573HP를 부여받았다.

<30> 또한 본 발명은 상기 탄수화물 가수 분해 효소를 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 상기 균주 *E. coli* BL21(DE3)pLysS를 배양하고, 여기서 세포를 회수하여 글래스 비드를 이용하여 세포를 깐 후 얻은 배양액으로부터 탄수화물 가수 분해 효소를 회수하는 것으로 이루어진다.

<31> 본 발명의 효소를 포함하는 조성물은 다양한 구강보호 제품, 예를 들어 치태제거, 구강 세정용 조성물, 치약 등에 사용될 수 있으며, 또한 본 발명의 효소는 텍스트란 및 아밀로오스와 같은 탄수화물 다당을 분해하는 능력을 가져 특히 설탕 제조시 텍스트란 제거용으로도 유용하게 사용될 수 있다. 또 본 발명의 효소를 포함하는 조성물은 껌, 음료, 유류 등의 식품에

응용될 수 있으며, 조성물의 구체적인 조성은 그것이 속하는 기술분야의 통상의 전문가에 의해 어렵지 않게 조합하여 결정될 수 있을 것이다.

<32> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

<33> 실시예 1: *Lipomyces starkeyi*에서 *lسا* 유전자의 클로닝

<34> 1) 균주 및 플라스미드

<35> 본 실시예에서 cDNA 분리 및 아밀레이즈 유전자 선별을 위한 DNA 도너(donor)로 사용한 균은 구성적으로 텍스트라네이즈와 아밀레이즈의 활성을 갖는 텍사메이즈를 생산하는 *Lipomyces starkeyi* KFCC 11077 이었다. *Escherichia coli* DH5 α 와 플라스미드 pGEM-T easy (Promega, USA) 는 일반적인 DNA 조작과 DNA 염기서열 분석을 위해 사용하였다. *E. coli* XL1-Blue and SOLR (Stratagene, USA) 는 cDNA library제작을 위한 숙주세포로 사용되었고, lambda phage Uni-ZAP XR (Stratagene, USA)는 벡터로 이용되었다.

<36> 2) 배양조건

<37> *L. starkeyi* 는 1% (w/v) 전분이 포함된 LW 배지에서 배양하였다. LW 배지는 0.3% (w/v) 효모 추출액 및 0.3% (w/v) KH_2PO_4 로 이루어졌다. 이 배지의 pH는 약 4.5로 HCl을 이용하여 맞추었다. 박테리아 배양을 위한 배지는 LB (1% 트립تون, 0.5% 효모 추출액, 1% NaCl, pH 7.3) 와 LBA (50 g 앰피실린/ml 함유 LB)를 이용하였다.

<38> 3) 탄수화물 분해 효소의 정제

<39> 전 배양은 LW 배지에 전분을 1% (w/v) 농도로 첨가하여 28°C에서 진탕 배양하였다. 이 후 10 L 발효조 (한일 R&D, 한국)를 이용하여 1% (w/v) 전분을 탄소원으로 8.3 L LW 배지에 배양하여 탄수화물 분해효소를 얻었다. 배양 상등액은 100 K cut off hollow-fiber (세한, 한국)를 이용하여 회수하였고, 이를 다시 30 K cut off hollow-fiber (Millipore, USA)로 830 ml 까지 농축을 하였다. 암모늄 살레이트 (Sigma Chemical Co, USA)를 70%까지 넣어 주어 단백질을 침전하고 원심분리한 후 침전물을 60 ml의 20 mM 포타슘 포스페이트 완충용액 (pH 6.4)으로 혼탁하였다. 단백질의 농도와 역가는 정제 단계별로 측정하였다. 단백질 농축액 (30 mg/1.5 ml) 을 20 mM 포타슘 포스페이트 완충용액 (pH 6.4)으로 평형화 시킨 DEAE-Sepharose 컬럼에 주입하고 NaCl로 0-1.0 M 까지 농도구배를 주어 단백질을 용출하였다. 활성이 보이는 분획을 모아 농축한 후 GPC 컬럼 (Bio-Rad Co., A-0.5 m, 70 cm x 2.6 cm)에 주입하여 분리하였으며, 사용한 컬럼은 50 mM 시트레이트 포스페이트 (pH 5.5) 완충용액으로 평형화 시켰고 투입한 단백질은 4 mg/ml이었다.

<40> 4) *L. starkeyi*로부터 폴리(A)+ RNA 분리

<41> *L. starkeyi*를 1% (w/v) 전분이 함유된 LW 배지 100 ml에 접종하여 28°C에서 36시간 배양하였다. 지수성장기 중반까지 배양 후 원심분리 (6,500 x g)하였고, 세포 펠렛을 회수하였다. 전체 RNA는 글래스-비드와 핫 엑시드 폐놀을 이용하여 분리하였다. 세포는 구아니디움 티오시아네이트 용액, 0.5% 소디움 라우릴사크로신, 0.1 M β -멜캅토에탄올 그리고 25 mM 소디움 시트레이트 (pH 7.0)과 혼합한 후, 동량의 냉각된 산-세척 글래스 비드 및 같은 양의 폐놀/클로로포름/이소아밀알코올 (25/24/1, v/v/v)를 혼합하여 5 분간 가장 높은 속도로 보텍스를 실시

하였다. 혼합액은 원심분리를 하였고, 3 배의 이소프로판올과 0.3 배의 3 M 소디움 아세테이트를 첨가하여 RNA 펠렛을 만들고, 다시 RNase 프리 증류수에 녹여 사용하였다.

<42> 5) NH₂-말단 아미노산 서열분석 및 올리고뉴클레오타이드 합성

<43> NH₂-말단의 아미노산 서열은 정제된 아밀레이즈 단백질을 Automated Protein Sequencer (model 471A, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 Edman degradation 방법으로 분석하였다.

<44> *L. starkeyi*에서 생산된 정제된 탄수화물 분해효소(LSA; 텍스트라나아제와 아밀라아제의 활성을 가지는 단백질 효소)의 N-말단 아미노산 서열 분석 결과 DXSTVTVLSSPETVT (X는 아미노산을 분석하지 못함) 이었다. 이 아미노산 서열(TVTVLSSPE)을 바탕으로 올리고뉴클레오타이드를 합성, 즉 프라이머 1 (5'-TACAGTTACGGTCTTGTCCCTCCCTGA-3')(서열목록 3)을 디자인하고 합성을 하였다. 그리고, 안티센스 프라이머 2 (5'-CTCTACATGGAGCAGATTCCA-3')(서열목록 4)를 제작하였다. PCR 산물은 전기영동을 통해 약 2 kb의 밴드를 얻었다.

<45> 6) *L. starkeyi* cDNA 라이브러리 제조

<46> 전분이 첨가된 배지에서 36시간 배양하여 얻은 폴리(A)+ RNA 5 g은 ZAP-cDNA Synthesis kit (Stratagene, USA)을 이용하여 cDNA를 합성을 하였다. 여기서 합성된 cDNA는 스판 컬럼 분획법에 의하여 500 bp 이상의 크기를 분리하였고, 이후 *Eco*R I - *Xho* I 절단된 Uni-ZAP XR 벡터와 라이게이션하였다. 라이게이션된 파아지 cDNA는 Gigapack Gold Kit (Stratagene, USA)를 이용하여 *in vitro* 패킹을 실시하였다.

<47> 7) *Isa* 클로닝

<48> LSA 효소 유전자 (*Isa*)의 오픈 리딩 프레임에 해당되는 DNA 단편은 텍스트라나아제와 아밀라아제의 효소 특성을 동시에 가지는 단백질의 N-말단 아미노산 서열에 해당하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머 서열 (5'-TACAGTTACGGTCTTGTCCCTCCCTGA-3')과 C-말단에 해당되는 반대방향의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 서열(5'-CTCTACATGGAGCAGATTCCA-3')를 제작하여 PCR을 실시하였다. PCR 산물은 아가로즈겔에서 분리하여 AccPrepTM gel extraction kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 정제하고 pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 라이게이션을 실시하였다. 염기서열분석 반응은 GeneAmp 9600 thermal cycler DNA sequencing system(model 373-18, Applied Biosystems, USA)을 이용하여 ABI PRISM Cycle Sequencing Kit(Perkin Elmer Corp. USA.)를 이용하여 수행하였다.

<49> 8) *E. coli*에서 LSA 단백질의 이종(heterologus) 발현 및 정제

<50> LSA 유전자는 pRSETB (Invitrogen, USA) 벡터에 *Sac* I-*Eco*RI site를 이용하여 클로닝을 실시하여 pRSET-LSA를 제작하였다. pRSET-LSA가 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)pLysS는 50 mg/1 앰피실린이 첨가된 LB 배지에서 중간정지 단계(midstationary phase)까지 37°C에서 배양하였다. 배양액에 IPTG를 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가한 후 28°C에서 6시간 배양을 실시한 후 세포를 회수하고, 원심분리 (5000 xg, 10 분)를 통해 0.1 M 포타슘 포스페이트(pH 7.4)로 세척을 하였다. 그리고 초음파분쇄기를 이용하여 세포를 용혈시켰다. 발현된 단백질은 Ni²⁺-니트릴로트리아세트산(NTA)-아가로즈(Quiagene, Germany)를 이용하여 정제를 실시하였다. 즉, 세포를 용혈시킨 후 얻은 효소액은 Ni²⁺-NTA와 혼합한 후 4°C에서 1시간 반응을 실시한 후 혼합

액은 컬럼에 로딩하였다. 컬럼은 세척 버퍼로 4번 세척하고 단백질은 0.5 mL씩 에멀젼 버퍼로 에멀젼화 하였다.

<51> 9) 단백질 전기영동 및 활성염색

<52> 소디움 도데실설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)는 트리스-글리신 완충 용액(pH 8.8)에 10%의 가교결합으로 연결된 폴리아크릴아미드 겔을 사용하였다. 겔에서 전분 구조 다당의 분해활성을 알아보기 위하여, 단백질 샘플을 1% 전분이 함유된 SDS-PAGE로 분리하였다. 전기영동 후에 SDS는 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액과 20%의 2-프로판올을 포함하는 용액에 1시간동안 세척을 하여 제거하였고, 이후 반응 완충용액 (50 mM 소디움 아세테이트, 5 mM CaCl₂, pH 5)에 담궈 37°C에서 2일간 반응하였다. 이후 겔은 요오드 용액 (0.3% 요오드, 3% 포타슘 요오드)에서 10 분간 담근 후 중류수로 씻어주었다. 이에따라 최종적으로 전분 구조 다당의 분해 활성은 갈색 바탕에 클리어 존(clear zone)이 생성된다.

<53> 단백질의 분자량은 미오신(200 kDa), β -갈락토시다아제(116 kDa), 포스포릴라아제 b (97.4 kDa), 혈청 알부민(66.2 kDa), 카보닉 안하이드라아제(31 kDa), 및 아프로티닌(6.5 kDa)로 비교 결정하였다.

<54> 10) 웨스턴 블롯 분석

<55> 전기영동 끝난 후, 겔의 단백질은 PVDF 멤브레인에 전기장을 이용하여 트랜

스페하였다. LSA는 토끼 폴리클로날 항체에 의해 측정하였는데, 이는 *L. starkeyi*에서 얻은 정제된 탄수화물 다당분해효소(carbohydrolase; 텍스트라나아제와 아밀라아제의 활성을 동시에 보이는 단백질 효소)의 특이성을 갖는다. 항-카보하이드로라아제-항체를 함유하는 혈청은 1:200의 비율로 희석하여 사용하였다. 항체에 반응을 실시한 후, 멤브레인은 0.1% Tween 20 (T)이 첨가된 트리스-완충 염수(TBS; 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl)에서 3번 씻어주었다. 항원-항체 복합체는 2차항체와 ECL Western blotting analysis system (Amersham Pharmacia, USA)에 의해 탐지하였다. 페옥시다아제-접합 항-토끼-IgG (Amersham Pharmacia, USA)는 1:1500로 희석을 하여 사용하였고, Biomax 필름 (Kodak, USA)에서 1분간 노출시켰다.

<56> 실시예 2: 효소의 탄수화물 가수 분해 활성 측정

<57> 환원 값(Reducing value)을 측정하기 위하여, DNS(3,5-디니트로살리시클릭산) 방법과 구리-바이신코나이네이트(copper-bicinchoninate) 방법을 이용하였다. 즉, 100 μ l 구리-바이신코나이네이트 시약과 100 μ l의 효소 반응액을 첨가한 후 80°C에서 35분간 반응시킨 후 약 15분정도 냉각을 시켜준다. 그리고 나서 560nm에서 흡광도를 측정하였다.

<58> 실시예 3: 효소의 pH, 온도에 대한 최적 활성과 안정성 측정

<59> LSA 효소 활성의 최적 pH는 pH 3 - 9(pH 1.0 간격) 범위에서의 반응속도를 통해 결정하였다. 이때, 20mM 시트레이트-포스페이트 버퍼(pH 4.0), 시트레이트/포스페이트 버퍼(pH 5-6), 그리고 소디움 포스페이트 버퍼(pH 7-9)를 사용하였으며 37°C에서 48시간 반응시켜 탄수화물

가수 분해의 활성 정도를 DNS(3,5-디니트로살리시클릭산) 방법을 사용하여 결정하였다. 효소의 pH 안정성은 각각의 버퍼에 효소를 넣어 22°C에서 3시간 방치한 후, 측정하였다.

<60> 효소의 최적 활성 온도는 다양한 온도(20 - 80°C, 10°C 간격)에 효소를 30분간 넣어 둔 후, 반응 속도를 측정하여 결정하였으며 온도 안정성은 다양한 온도(20 - 90°C, 10°C 간격)에 효소를 30분간 넣어 둔 후, 남은 활성도를 측정하여 구하였다. 이때 효소의 활성 및 안정성은 1%(w/v) 전분을 기질로 이용하여 측정하였다.

<61> 실시예 4: 금속이온, 칼레이팅 용액과 변성용액에 대한 영향

<62> EDTA, EGTA와 금속이온의 영향을 ZnCl₂, CuSO₄, CaCl₂ 그리고 MgCl₂(최종농도: 5 mM)를 이용하여 측정하였다. EDTA와 EGTA의 최종농도는 1mM이다. 소디움 도데실 셀페이트(SDS; 0.1%, 0.5%, 1%, 2%), 우레아(2M), 아세톤(0~80%) 및 에탄올(0~70%)이 효소 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 효소는 37°C에서 30분간 반응을 실시한 후 활성을 측정하였으며, 기질로 2% 전분을 이용하였다.

<63> 결과

<64> *Lipomyces starkeyi*에서 *lسا* 유전자의 클로닝

<65> *L. starkeyi*에서 생산된 정제된 탄수화물 분해효소(LSA; 텍스트라나아제와 아밀라아제의 활성을 가지는 단백질 효소)의 N-말단 아미노산 서열 분석 결과 DXSTVTVLSSPETVT (X는 아미노산을 분석하지 못함)이다. 아미노산 서열 분석 (TVTVLSSPE)을 이용하여 프라이머 1 (5'-TACAGTTACGGTCTTGTCCCTCCCCCTGA-3')을 디자인하고 합성을 하였다. 그리고, 안티센스 프라이

며 2 (5'-CTCTACATGGAGCAGATTCCA-3')를 제작하였다. PCR 산물은 전기영동을 통해 약 2 kb의 밴드를 얻었다. 아미노산 및 염기 서열분석 결과를 도 1, 그리고 서열 목록 1 및 2에 나타내었다.

<66> *lسا* 유전자의 특성

<67> LSA 유전자는 텍스트라나아제와 아밀라아제를 생산하는 돌연변이체 (*L. starkeyi* KFCC 11077)으로부터 1946 bp cDNA로 클로닝되었다. cDNA 단편의 뉴클레오타이드인 경우, 오픈 리딩 프레임은 비변형 LSA 전구체는 1944 bp로 71.889 Da (648개의 아미노산)으로 이뤄졌으며, 성숙 단백질인 경우 1860 bp로 620개의 아미노산 (68.779 Da)으로 이루어졌다. 성숙 단백질이 되기 위해 프로세싱되는 사이트는 Arg²⁸ 과 Asp²⁹ 사이에 위치하는 것으로 추정되었다(도 1).

<68> LSA ORF는 뉴클레오타이드 1번부터 ATG 개시코돈에서 시작하고, 1944번까지인 뉴클레오타이드인 TAG에서 종결된다. 추정되는 LSA 아미노산은 여러 가지 효모, 식물의 α -아밀라아제, 박테리아에서 생산되는 시클로텍스트린, 글루카노트랜스퍼라아제, 플루나아제, α -글리코시다아제 그리고 *B. polymyxa*에서 생산되는 β -아밀라아제와 유사성을 갖는다. LSA는 *L. kononenkoae*, *Sw. occidentalis* (AMY1) 및 *Sh. fibuligera* (ALP1)의 α -아밀라아제와 78에서 52%의 상동성을 갖는다[Park, J.C., Bai, S., Tai, C.Y. and Chun, S.B. (1992) Nucleotide sequence of the extracellular α -amylase gene in the yeast *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 26077.

FEMS Microbiol Lett. 93, 17-24; Steyn, A.J.C., Marmur, J. and Pretorius, I.S. (1995)

Cloning, sequence analysis and expression in yeasts of a cDNA containing a α -amylase-encoding gene. GENE. 166, 65-7; (1987) Nucleotide sequence of the α -amylase gene (ALP1) in the yeast 219, 339-342]. 본 발명에서 얻은 LSA 유전자와 다양한 아밀로즈분 해성 효소의 4개의 보존 부위를 비교하여 하기 표 1에 나타내었다.

<69> 【표 1】

효소	보존부위 I	보존부위 II	보존부위 III	보존부위 IV
LSA	287 DIVVNH	372 GIRDIVKH	399 GEVFD	462 ELENQD
AMYA	134 DVVANH	221 GIRDIDARH	248 GEVFQ	313 FIENHD
ALP1	146 DIVTNH	233 GIRDIDSAKH	260 GEVFQ	324 FVENHD
SWA2	151 DIVTNH	238 GIRDIDSAKH	265 GEVYD	327 FIENHD
AMY2	141 DTVVNH	226 GIRDIDATKH	257 GEETWT	316 FLESQD
LKA1	264 DIVVNH	349 GIRDIDIVKH	376 GEVFD	439 ELENQD
NPL	242 DAVFNH	324 GWRIDDVANE	356 GEIWH	419 LLGSHD
IAM	291 DVVYNH	370 GEREIDLASV	453 VEWSV	502 FIDVHD
PUL1	600 DVVYNH	671 GEREIDLMGY	703 BEGWD	827 YVSKHD
PUL2	281 DVVYNH	348 GEREIDLMDI	381 BEGWD	464 YVESHD
CGT1	130 DVADNH	219 AIRIDDAIKH	256 GEWFG	328 FMDNHD
CGT2	135 DFAPNH	225 GIREDAVKH	257 GEWYL	324 FIDNHD
CGT3	135 DFAPNH	225 GIRDIDAVKH	256 GEWFG	323 FIDNHD
CGT4	131 DFAPNH	221 GIRDIDAVKH	252 GEWFL	319 FIDNHD
BE1	335 DVVPGH	401 AIRIDAVAS	425 NEFGG	521 IGPLSHD
BE2	370 DVVPGH	436 GIRDIDAVAS	460 NEYGG	556 IALSHD
BE3	207 DVVHSH	347 GEREIDGVTS	372 GEYFS	470 YAESHD
MAL	106 DLVTNH	210 GEREIDTAGL	275 GEVAH	344 YTENHD
1,6G	98 DLVVNH	195 GEREIDVNH	224 GEPMG	324 YWNHHD

<70> 보존 부위내에 있는 6개의 아미노산이 일치하며, 이를 박스로 표시하였다. 효소 약어:

LSA, *Lipomyces starkeyi* α -amylase; AMYA, *Aspergillus nidulans* α -amylase; ALP1, *Seraccharomyces fibuligera* α -amylase; SWA2, *Debaromyces occidentalis* α -amylase; AMY2, *Serchizosaccharomyces pombe* α -amylase; LKA1, *L. kononenkoae* α -amylase; NPL, *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase; IAM, *Pseudomonas amyloboramosa* isoamylase; PUL1,

Klebsiella aerogenes pullulanase; PUL2, *B. stearothermophilus* pulluanase; CGT1, cyclodextrin glucanotransferase; CGT2, *Paenibacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase; CGT3, alkaliphilic *Bacillus* sp. cyclodextrin glucanotransferase; CGT4, *B. stearothermophilus* cyclodextrin glucanotransferase; BE1, *Escherichia coli* branching enzyme; BE2, *Serynochococcus* sp. branching enzyme; BE3, Metaize . branching enzyme; MAL, *Seraccharomyces carisbergensis* maltase; 1,6G, *B. cereus* oligo-1,6-glucosidase.

<71> 게노믹 DNA에는 1개의 인트론이 있으며, cDNA의 966번과 697번째 염기 사이에 존재한다. 그리고, 인트론의 길이는 60개의 염기로 이루어져 있다 (5'-GTGGTATGTATCTAAGCATATTGTAGCATCTATCTGGAACTGACCGGCCCTCAGTGC-3'). 본 발명에서 얻은 재조합 LSA와 모균(*Lipomyces starkeyi*)의 LSA (약 100 kDa) 사이의 SDS-PAGE로 측정한 분자량은 차이가 있었으며 이는 모균의 효소는 효모균에 의해서 생산이 되는 당단백질로 글리코실화의 영향 때문으로 판단된다. 모균의 탄수화물 분해효소인 경우, 항-카보하이드로라아제 항체가 약 100 kDa을 인식한다. 또한 활성이 있는 LSA 효소는 서로 응집되어 끓이지 않는 경우 젤 투과 크로마토그래피에 의해서 200 kDa으로 활성단백질이 확인되었다(도 2).

<72> *lسا* 유전자의 발현

<73> IPTG를 이용하여 *E. coli*에서 인더션후, 세포를 회수한 다음, 초음파분쇄기로 세포를 깼다. 그리고 회수된 단백질은 His-표지 친화 컬럼을 이용하여 정제를 실시하였고, SDS-PAGE(10%)를

이용하여 분석하였다(도 3, 레인 1). 발현된 주 밴드의 크기는 73 kDa (LSA + His-표지) 이었다. 정제된 효소의 전분 구조 다당의 분해 특성을 알아보기 위하여 전분이 첨가된 PAGE 겔에 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 37°C에서 30분 방치한 후 요오드 용액으로 염색하여 전분 구조 다당 분해 활성을 확인하였다. 이때 전분 구조 다당 분해 활성을 갖는 부분인 LSA 밴드부분은 클리어 존이 형성됨을 알 수 있었다(도 3, 레인 2). 웨스턴 블롯 분석에서는 항-카보하이드로라아제 항체는 약 73 kDa (LSA + His-표지)위치의 단백질을 인식하였다(도 3, 레인 3).

<74> LSA 효소의 생화학적 특성

<75> LSA 효소의 아밀라아제 활성에 대한 최적 온도는 40°C이었다. 그리고 20에서 50°C 사이에서 온도에 대해 안정성을 가지며, 60°C에서는 3시간 배양 시 원래 활성의 70%정도로 감소하였다(도 4). LSA 효소의 아밀라아제 활성에 대한 최적 pH는 6이며, 5-8 사이의 pH 범위에서 효소의 활성이 안정적이었다(도 5).

<76> 이 효소의 전분 구조 다당 분해 활성은 5 mM Cu²⁺에 의해서 저해되나, 5 mM의 Ca²⁺ 및 Mg²⁺를 첨가한 경우, 약 315와 220%의 활성이 증가되었다(표 2). 효소 활성은 1 mM EGTA에 의해서는 영향을 미치지 않으나, 1 mM EDTA에 의해서는 저해를 받았다. 또한 전분 구조 다당 분해 활성은 SDS에 의해서는 완전히 저해되나, 우레아와 아세톤에서는 증가하였다. LSA 효소는 10-40% 아세톤이나 10-20% 에탄올에서는 활성이 증가 (각각 1.03-1.22배, 1.25-1.33배) 됨을 알 수 있었고 고농도인 60% 아세톤 또는 60% 에탄올의 존재하에서도 본래의 활성의 50%이하가

유지 됨을 알 수 있었다(도 6 및 도 7). 이러한 높은 안정성 결과는 알려진 전분 구조 다당 분해 활성의 효소들과는 크게 다른 특성이었다.

<77> 【표 2】

금속이온, 칼레이트제 및 변성 용액이 LSA 효소 활성에 미치는 영향		
성분	농도	상대적 활성(%)
무첨가		100
CaCl ₂ + EDTA	5mM/1mM	185
CaCl ₂	5mM	315
CuSO ₄ + EDTA	5mM/1mM	12
CuSO ₄	5mM	20
MgCl ₂ + EDTA	5mM/1mM	129
MgCl ₂	5mM	220
EGTA	1mM	105
EDTA	1mM	46
SDS	2% 1% 0.5% 0.1%	12 24 49 66
우레아	2M	115
아세톤	30% 20%	115 122

<78> LSA와 2%의 전분을 반응시켰을 때, 반응초기 동안은 말토펜토즈 보다 더 큰 올리고당이 생성되었다. 그리고, 이들 말토 올리고당은 순차적으로 말토펜토즈와 더 작은 당으로 분해되었다. 최종산물은 말토트리오즈와 말토테트라오즈가 주로 생성되었다(도 8A). LSA를 말토올리고당 시리즈(maltose에서 maltoheptoase)와 혼합하여 반응을 실시한 결과, LSA는 G2와 G3는 분해를 하지 않으나, G4는 G2로 G5는 G2와 G3로 G6는 G2와 G4 또는 G3와 G3로 G7은 G3와 G4로 분해하였다(도 8B). 또한 LSA는 아밀로펙틴, 전분(용해성), 글리코겐을 강하게 분해하고 이외에도 아밀로즈, 아밀로 텍스트린, 텍스트란, 알파-시클로텍스트린, 플루란 등을 약하게 분해함을 확인하였다(표 3).

<79> 【표 3】

LSA 효소의 상대적 기질특이성

기질	상대적 활성(%)
전분	100
아밀로펙틴	141
글리코겐	80
아밀로즈	41
아밀로텍스트린	17
텍스트란	4
알파-CD	4
플루란	3

【발명의 효과】

<80> 본 발명에 의해 제공되는 효소는 아밀로펩틴, 전분, 글리코겐 및 아밀로즈 등과 같은 여러가지 탄수화물 다당을 효과적으로 분해할 수 있다. 또한, 본 발명의 효소는 치태제거나 구강세정용으로 유용하며 또한 텍스트란 분해능을 가져 설탕 제조시 텍스트란 제거용 혹은 설탕 제조공정중 오염되는 다당의 제거에 활용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

아밀로펩틴, 전분, 글리코겐 및 아밀로즈 분해활성을 갖는 서열 목록 1의 아미노산을 포함하는 단백질, 이의 변이체, 또는 이들의 단편.

【청구항 2】

제 1항의 단백질, 이의 변이체, 또는 이들의 단편을 코딩하는 서열 목록 2의 유전자, 그 변이체, 또는 이들의 단편.

【청구항 3】

제 2항의 유전자, 이의 변이체, 또는 이들의 단편을 발현하는 형질전환된 세포.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 상기의 세포는 원핵 세포 또는 진핵세포인 것을 특징으로 하는 세포.

【청구항 5】

제 3항 또는 제 4항에 있어서, 상기 세포는 *E. coli* BL21(DE3)pLysS (KCTC10573HP, 2003.12.24)인 것을 특징으로 하는 세포.

【청구항 6】

- (a) 제 3항의 세포를 배양하는 단계;
- (b) 상기 배양된 세포에서 효소를 발현하는 단계; 및
- (c) 발현된 효소를 정제하는 단계를 포함하는 정제된 아밀로펩틴, 전분, 글리코겐 및 아밀로즈 분해활성을 갖는 효소의 생산 방법.



0040006186

출력 일자: 2005/1/13

【청구항 7】

제 6항의 방법에 의해 생산된 효소.

【청구항 8】

제 7항의 효소를 포함하는 조성물.

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 상기 조성물은 설탕 제조시 텍스트란 제거용으로 사용됨을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 10】

제 8항에 있어서, 상기 조성물은 치태제거 또는 구강세정용으로 사용됨을 특징으로 하는 조성물.

【도면】

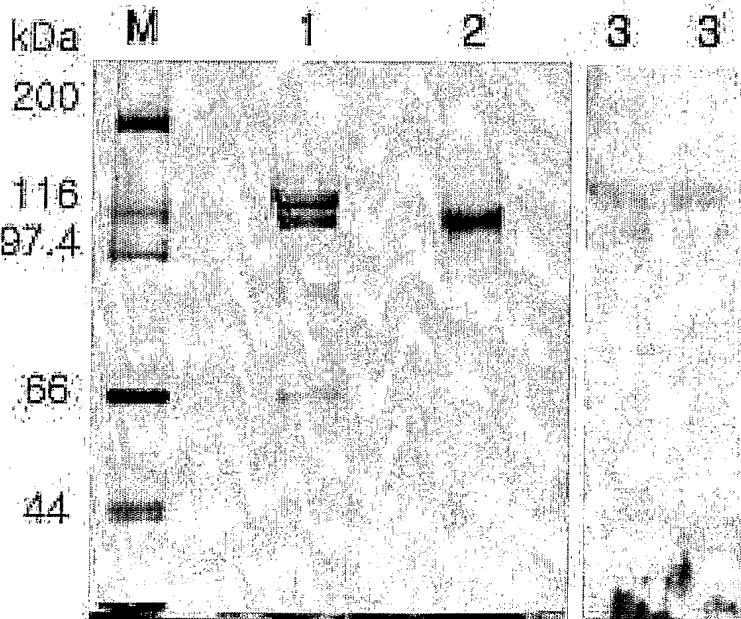
【도 1a】

1 atgttgctgatcaactttcatcgctgttctgggagtgatatactgttcctattgtg
 1 Met Leu Leu Ile Asn Phe Phe Ile Ala Val Leu Gly Val Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val
 61 gttgctcgatatttttcgacgagattgcactacagttacggcttcctcccttag
 21 Val Ala Arg Tyr Ile Leu Arg Arg Asp Cys Thr Thr Val Thr Val Leu Ser Ser Pro Glu
 121 tctgtgacgagttcgaaccatgttcagctagccagtcatacgatgtgcacagtt
 41 Ser Val Thr Ser Ser Asn His Val Glu Leu Ala Ser His Glu Met Cys Asp Ser Thr Leu
 181 tcagcgtcccttatatacataatgtgattatgataaagattgtgcacacttattatctt
 61 Ser Ala Ser Leu Tyr Ile Tyr Asn Asp Asp Tyr Asp Lys Ile Val Thr Leu Tyr Tyr Leu
 241 acatcgtcgggcacaactgggtccgtaaacagcgtcttattctttagttgagtaacaac
 81 Thr Ser Ser Gly Thr Thr Gly Ser Val Thr Ala Ser Tyr Ser Ser Leu Ser Asn Asn
 301 tgggaatttgttctctcggctccggctgcagatgcgtcgcagatcaactggagctagt
 101 Trp Glu Leu Trp Ser Leu Ser Ala Pro Ala Ala Asp Ala Val Glu Ile Thr Gly Ala Ser
 361 tatgttagacagcgatgcacatcgacatacggccacgtctttgatataccttactacc
 121 Tyr Val Asp Ser Asp Ala Ser Ala Thr Tyr Ala Thr Ser Phe Asp Ile Pro Leu Thr Thr
 421 acgacaaacgtcgcttctgtcttagtgcgacttcaacatcttagtctaaccacaacatct
 141 Thr Thr Ser Ser Ser Ala Ser Ala Thr Ser Thr Ser Leu Thr Thr Ser
 481 agtgtttccatttcgggtgtccgtccctacaggaacacgtctgcacaaattggcgaggttagggct
 161 Ser Val Ser Ile Ser Val Ser Val Pro Thr Gly Thr Ala Ala Asn Trp Arg Gly Arg Ala
 541 atctatcagatcgtactgatagattgcacgcactgacggctccaccatatttatgc
 181 Ile Tyr Glu Ile Val Thr Asp Arg Phe Ala Arg Thr Asp Gly Ser Thr Tyr Leu Cys
 601 gatgttacccatagggtctattgcggagggtcttacagggattatcaataatgcggat
 201 Asp Val Thr Asp Arg Val Tyr Cys Gly Ser Tyr Glu Gly Ile Ile Asn Met Leu Asp
 661 tacatccaaaggcatggctttaactgctattggatttccctatagtgaaaaatattccc
 221 Tyr Ile Glu Gly Met Gly Phe Thr Ala Ile Trp Ile Ser Pro Ile Val Glu Asn Ile Pro
 721 gatgacacccgatacggttacgcatacatcatggattttgtatggatataatcc
 241 Asp Asp Thr Gly Tyr Gly Tyr Ala Tyr His Glu Tyr Trp Met Lys Asp Ile Phe Ala Leu
 781 aatacaaattttggactgcagacgatggatagcgttggctacggataatcgc
 261 Asn Thr Asn Phe Gly Thr Ala Asp Asp Leu Ile Ala Leu Ala Thr Glu Leu His Asn Arg
 841 ggcatgtacttgcattttgtatggatattttgtcaatcaacttgcatttcaggaaatgc
 281 Gly Met Tyr Leu Met Val Asp Ile Val Val Asn His Phe Ala Phe Ser Gly Ser His Ala
 901 gacgtggactacttgcataatattccgtattgcgtccaggattttcatcattttgc
 301 Asp Val Asp Tyr Ser Glu Tyr Phe Pro Tyr Ser Ser Glu Asp Tyr Phe His Ser Phe Cys
 961 tggattacagattactcgaatcagacaaacgttggatggcgttgcgttggcgacgatact
 321 Trp Ile Thr Asp Tyr Ser Asn Glu Thr Asn Val Glu Gin Cys Trp Leu Gly Asp Asp Thr
 1021 gttccctctcgatggacttgcataatcccaacttgcacaccgtgaaaatgtatcaatcctgg
 341 Val Pro Leu Val Asp Val Asn Thr Glu Leu Asp Thr Val Lys Ser Glu Tyr Gin Ser Trp
 1081 gttcaagaacttatacttaattacttgcacggcataagaattgacaccgtcaagcac
 361 Val Glu Glu Leu Ile Ala Asn Tyr Ser Ile Asp Gly Leu Arg Ile Asp Thr Val Lys His
 1141 gtgcagatggattttggcaccattcaagaggctgcaggattacgcgttgggtgaa
 381 Val Glu Met Asp Phe Trp Ala Pro Phe Glu Ala Ala Gly Ile Tyr Ala Val Gly Glu
 1201 gtattcgcacgggtatccatcatacatgtccatatacgaaaaatctgacgggtcttgc
 401 Val Phe Asp Gly Asp Pro Ser Tyr Thr Cys Pro Tyr Glu Glu Asn Leu Asp Gly Val Leu
 1261 aattatcctgtttattatcctgtcgtctgcgtttagatgttagtgggtcggtctcc
 421 Asn Tyr Pro Val Tyr Tyr Pro Val Val Ser Ala Phe Glu Ser Val Ser Gly Ser Val Ser
 1321 tcgttagtcgatatacgatgcataactgtcaatgcacccgacactactctcttaggc
 441 Ser Leu Val Asp Met Ile Asp Thr Leu Lys Ser Glu Cys Thr Asp Thr Leu Leu Gly
 1381 tccttctagagaatcaagataatccgcgattccctagctacacttctgtatggatcttta
 461 Ser Phe Leu Glu Asn Asp Asn Pro Arg Phe Pro Ser Tyr Thr Ser Asp Glu Ser Leu
 1441 attaaaaatgcgatcgcttcaatgcgttgcacggcattccataatttattacgg
 481 Ile Lys Asn Ala Ile Ala Phe Thr Met Leu Ser Asp Gly Ile Pro Ile Tyr Tyr Gly

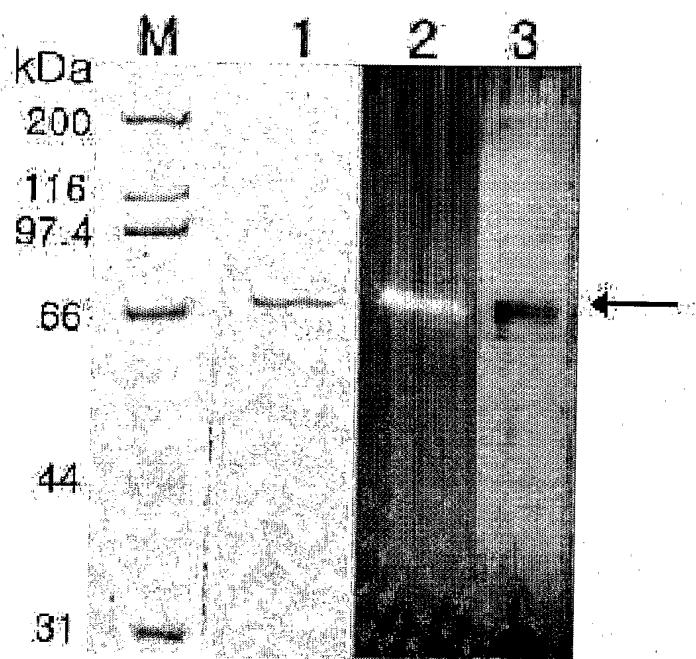
【도 1b】

1501 caggagccaaggcctcaatggtggaaacgatccctataatcgagaggcgcttggcttacg
 501 Glu Glu Gln Gly Leu Asn Gly Gly Asn Asp Pro Tyr Asn Arg Glu Ala Leu Trp Leu Thr
 1561 ggctactccacaacgtcgacgttctacaatatacttgcgtcgatcagatttagaaat
 521 Gly Tyr Ser Thr Ser Thr Phe Tyr Lys Tyr Ile Ala Ser Leu Asn Glu Ile Arg Asn
 1621 caggctatatacaaagatgatacttctcacatatacagaactgggttatttattcgat
 541 Glu Ala Ile Tyr Lys Asp Asp Thr Tyr Leu Thr Tyr Glu Asn Trp Val Ile Tyr Ser Asp
 1681 tccacgacaatagcaatgcggaaagggtttacagggaaaccaaataattacgggtctgtca
 561 Ser Thr Thr Ile Ala Met Arg Lys Gly Phe Thr Gly Asn Glu Ile Ile Thr Val Leu Ser
 1741 aatcttgggaccagtggcagttcgacacttgcacgcgttgcatacggatataccgca
 581 Asn Leu Gly Thr Ser Gly Ser Tyr Thr Leu Thr Leu Ser Asn Thr Gly Tyr Thr Ala
 1801 tctagcgttgtatatgagatcttgacatgcacagctgtgactgtggattcgctgtggaaat
 601 Ser Ser Val Val Tyr Glu Ile Leu Thr Cys Thr Ala Val Thr Val Asp Ser Ser Gly Asn
 1861 ttggcagtgccgatgtccagtggcctaccaaaagtctttatcaggaatcgcactgggt
 621 Leu Ala Val Pro Met Ser Ser Gly Leu Pro Lys Val Phe Tyr Glu Glu Ser Gln Leu Val
 1921 ggctctggaatctgctccatgttagag
 641 Gly Ser Gly Ile Cys Ser Met

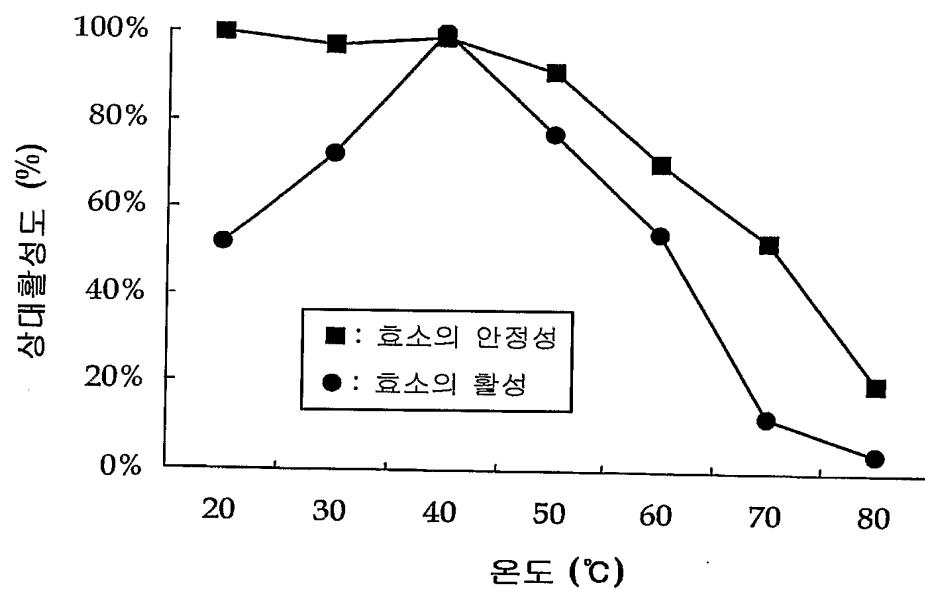
【도 2】



【도 3】



【도 4】

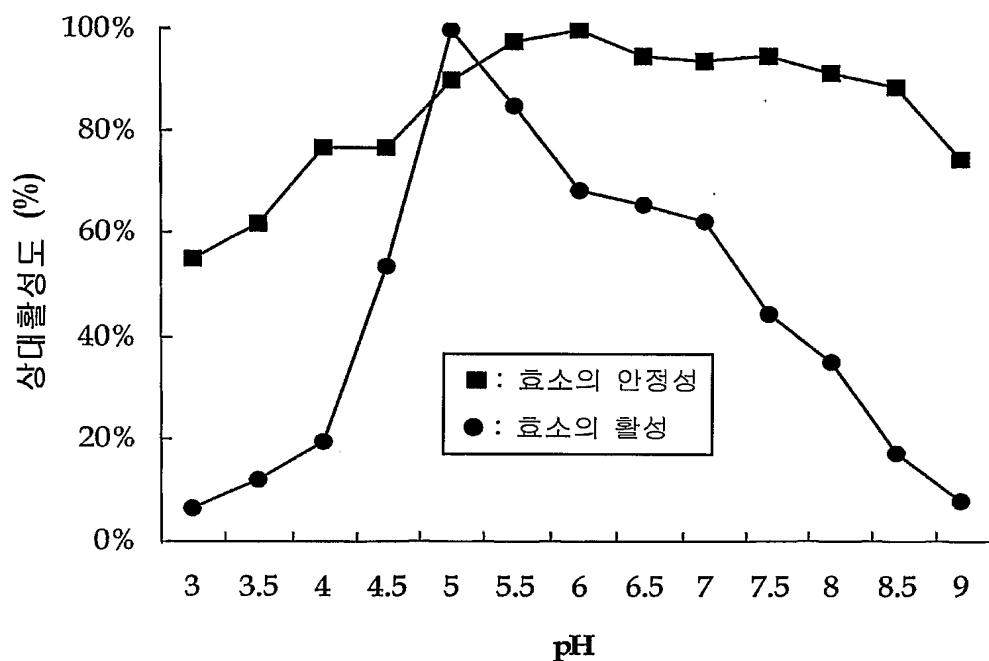




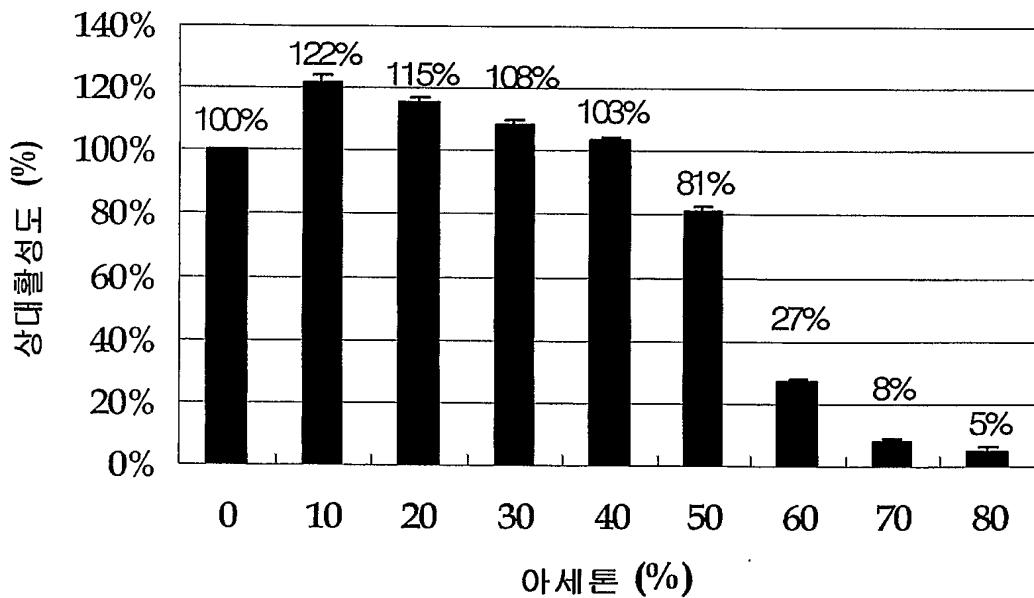
0040006186

출력 일자: 2005/1/13

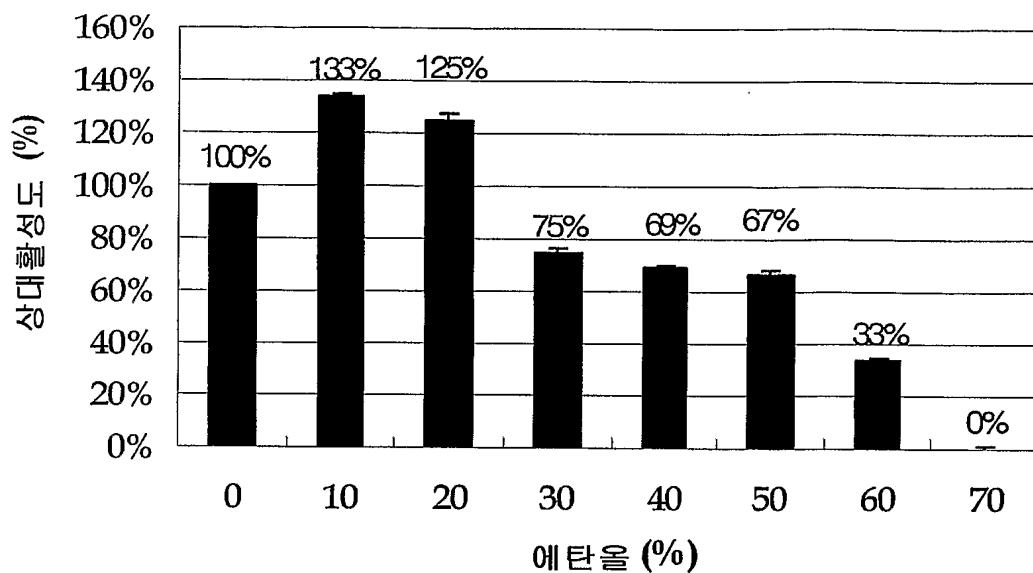
【도 5】



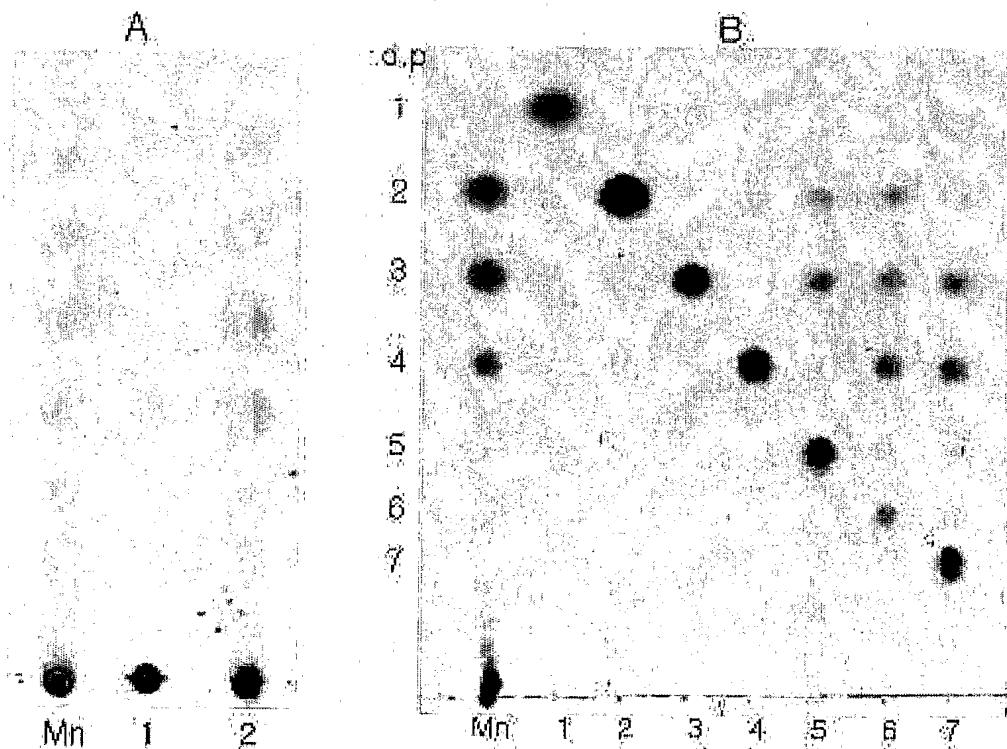
【도 6】



【도 7】



【도 8】



【서열목록】

<110> KIM, do man <120> Protein with the hydrolysis of amylopectin, starch,

glycogen and amylose, gene encoding said protein, the expressing host cell and methods for producing said protein <160> 4 <170> Kopatent In 1.71 <210> 1 <211> 647 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> E. coli BL21(DE3)pLysS <400> 1 Met Leu Leu Ile Asn Phe Phe Ile Ala Val Leu Gly Val Ile Ser Leu 1 5 10 15 Ser Pro Ile Val Val Ala Arg Tyr Ile Leu Arg Arg Asp Cys Thr Thr 20 25 30 Val Thr Val Leu Ser Ser Pro Glu Ser Val Thr Ser Ser Asn His Val 35 40 45 Glu Leu Ala Ser His Glu Met Cys Asp Ser Thr Leu Ser Ala Ser Leu 50 55 60 Tyr Ile Tyr Asn Asp Asp Tyr Asp Lys Ile Val Thr Leu Tyr Tyr Leu 65 70 75 80 Thr Ser Ser Gly Thr Thr Gly Ser Val Thr Ala Ser Tyr Ser Ser Ser 85 90 95 Leu Ser Asn Asn Trp Glu Leu Trp Ser Leu Ser Ala Pro Ala Ala Asp 100 105 110 Ala Val Glu Ile Thr Gly Ala Ser Tyr Val Asp Ser Asp Ala Ser Ala 115 120 125 Thr Tyr Ala Thr Ser Phe Asp Ile Pro Leu Thr Thr Thr Ser 130 135 140 Ser Ser Ser Ala Ser Ala Thr Ser Thr Ser Leu Thr Thr Ser 145 150 155 160 Ser Val Ser Ile Ser Val Ser Val Pro Thr Gly Thr Ala Ala Asn Trp 165 170 175 Arg Gly Arg Ala Ile Tyr Glu Ile Val Thr Asp Arg Phe Ala Arg Thr 180 185 190 Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Leu Cys Asp Val Thr Asp Arg Val Tyr

Cys	195	200	205	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Gly	Ile							
Ile	Asn	Met	Leu	Asp	Tyr	Ile	Glu	Gly	210	215	220						
Met	Gly	Phe	Thr	Ala	Ile	Trp	Ile	Ser	Pro	Ile	Val	Glu	Asn	Ile	Pro	225	
230	235	240	Asp	Asp	Thr	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Ala	Tyr	His					
Gly	Tyr	Trp	Met	Lys	Asp	245	250	255									
Ile	Phe	Ala	Leu	Asn	Thr	Asn	Phe	Gly	Thr	Ala	Asp	Asp	Leu	Ile	Ala	260	
265	270	Leu	Ala	Thr	Glu	Leu	His	Asn	Arg	Gly	Met	Tyr	Leu	Met	Val	Asp	
Ile	275	280	285	Val	Val	Asn	His	Phe	Ala	Phe							
Ser	Gly	Ser	His	Ala	Asp	Val	Asp	Tyr	290	295	300						
Ser	Glu	Tyr	Phe	Pro	Tyr	Ser	Ser	Glu	Asp	Tyr	Phe	His	Ser	Phe	Cys	305	
310	315	320	Trp	Ile	Thr	Asp	Tyr	Ser	Asn	Glu	Thr	Asn					
Val	Glu	Gln	Cys	Trp	Leu	325	330	335									
Gly	Asp	Asp	Thr	Val	Pro	Leu	Val	Asp	Val	Asn	Thr	Glu	Leu	Asp	Thr	340	
345	350	350	Val	Lys	Ser	Glu	Tyr	Gln	Ser	Trp	Val	Glu	Glu	Leu	Ile	Ala	Asn
Tyr	355	360	365	Ser	Ile	Asp	Gly	Leu	Arg	Ile							
Asp	Thr	Val	Lys	His	Val	Glu	Met	Asp	370	375	380						
Phe	Trp	Ala	Pro	Phe	Glu	Glu	Ala	Ala	Gly	Ile	Tyr	Ala	Val	Gly	Glu	385	
390	395	400	Val	Phe	Asp	Gly	Asp	Pro	Ser	Tyr	Thr	Cys					
Pro	Tyr	Glu	Glu	Asn	Leu	405	410	415									
Asp	Gly	Val	Leu	Asn	Tyr	Pro	Val	Tyr	Tyr	Pro	Val	Val	Ser	Ala	Phe	420	
425	430	430	Glu	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Ser	Leu	Val	Asp	Met	Ile	Asp

Thr 435 440 445 Leu Lys Ser Glu Cys Thr Asp
 Thr Thr Leu Leu Gly Ser Phe Leu Glu 450 455 460
 Asn Glu Asp Asn Pro Arg Phe Pro Ser Tyr Thr Ser Asp Glu Ser Leu 465
 470 475 480 Ile Lys Asn Ala Ile Ala Phe Thr Met Leu
 Ser Asp Gly Ile Pro Ile 485 490 495
 Ile Tyr Tyr Gly Glu Glu Gln Gly Leu Asn Gly Gly Asn Asp Pro Tyr 500
 505 510 Asn Arg Glu Ala Leu Trp Leu Thr Gly Tyr Ser Thr Thr Ser Thr
 Phe 515 520 525 Tyr Lys Tyr Ile Ala Ser Leu
 Asn Glu Ile Arg Asn Glu Ala Ile Tyr 530 535 540
 Lys Asp Asp Thr Tyr Leu Thr Tyr Glu Asn Trp Val Ile Tyr Ser Asp 545
 550 555 560 Ser Thr Thr Ile Ala Met Arg Lys Gly Phe
 Thr Gly Asn Glu Ile Ile 565 570 575
 Thr Val Leu Ser Asn Leu Gly Thr Ser Gly Ser Ser Tyr Thr Leu Thr 580
 585 590 Leu Ser Asn Thr Gly Tyr Thr Ala Ser Ser Val Val Tyr Glu Ile
 Leu 595 600 605 Thr Cys Thr Ala Val Thr Val
 Asp Ser Ser Gly Asn Leu Ala Val Pro 610 615 620
 Met Ser Ser Gly Leu Pro Lys Val Phe Tyr Glu Glu Ser Gln Leu Val 625
 630 635 640 Gly Ser Gly Ile Cys Ser Met
 645 <210> 2 <211> 1946 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
 <223> E. coli BL21(DE3)pLysS <400> 2 atgttgctga tcaactttt catcgctgtt
 ctgggagtga tatcactgtc tcctattgtg 60 gttgctcggtt atattcttcg acgagattgc

actacagttt cggctttgtc ctccctgag
 gccagtcatg agatgtgcga cagtacctg
 tatgataaga ttgtgacact ttattatctt
 gcgtcttatt ctcttagttt gagtaacaac
 gcagatgctg tcgagatcac tggagctagt
 gccacgtctt ttgatatacc tcttactacc
 actcaacat ctatgtctaac cacaacatct
 ggaacagctg caaattggcg aggttagggct
 cgcaactgacg gctccaccac atatttatgc
 tcttatcagg ggattatcaa tatgctggat
 tggatttctc ctatagtggaa aaatattccc
 gtttattggaa tgaaagatat ctgcgcctg
 atagcgttgg ctacggaatt gcataatcgc
 aatcactttg ctttctcagg aagtcatgcc
 tcgtcccagg attatttca ttcatttgc
 gttgaggcagt gctggcttgg cgacgatact
 gacaccgtga aaagtgaata tcaatcctgg
 gacggcctaa gaattgacac cgtcaagcac
 gagggctgcag ggatttacgc cgttggtgaa
 ccatatcagg aaaattttga cggtgttttg
 gcgtttgaga gtgttagtgg gtcggcttcc

120 tctgtgacga gttcgaacca tgttcagcta
 180 tcagcgtccc ttatatatcta caatgatgat
 240 acatcgtcgg gcacaactgg gtccgtaaca
 300 tggaaattgt ggtctctctc ggctccggct
 360 tatgttagaca gcgatgcatac tgcgacatac
 420 acgacaacgt cgtcgtcttc tgctagtgcg
 480 agtgtttcca tttcgggtgc cgtccctaca
 540 atctatcaga tcgtgactga tagatttgca
 600 gatgttaccg atagggtcta ttgcggaggg
 660 tacatccaag gcatggcct tactgctatt
 720 gatgacacccg gatacggtta cgcatatcat
 780 aatacaaatt ttggtaactgc agacgatttg
 840 ggcacgttact tgcgttgc tattgttgc
 900 gacgtggact actctgaata ttcccgtat
 960 tggattacag attactcgaa tcagacaaac
 1020 gttcctctcg tggacgtcaa taccaactt
 1080 gttcaagaac ttatagctaa ttactctatt
 1140 gtgcagatgg attttgggc accattcaa
 1200 gtattcgcacg gtgatccatc ctacacatgt
 1260 aattatcctg tttattatcc tgtcgtctct
 1320 tcgttagtgc atatgattga tacgctcaag

tctgaatgca ccgacactac ttccttagc	1380 tcctttctag agaatcaaga taatccgcga
ttcccttagct acacttctga tgagtctta	1440 attaaaaatg cgatcgctt cactatgctc
tcagacggca ttcccataat ttattacggt	1500 caggagcaag gcctcaatgg tggaaacgat
ccctataatc gagaggcgct ttggcttacg	1560 ggctactcca caacgtcgac gttctacaaa
tacattgcgt cggtgaatca gattagaaat	1620 caggctatat acaaagatga tacttatctc
acatatcaga actgggttat ttattcggat	1680 tccacgacaa tagcaatgcg gaaaggttt
acagggAACc aaataattac gttctgtca	1740 aatcttggga ccagtggcag ttcgtacact
ttgacgctt cgaatacggg atataccgca	1800 tctagcgttg tatatgagat ctgacatgc
acagctgtga ctgtggattc gtctggaaat	1860 ttggcagtgc cgatgtccag tggcctacca
aaagtctttt atcaggaatc gcaactggtt	1920 ggctctggaa tctgctccat gtagag
1946 <210> 3 <211> 27 <212>	DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
L. starkeyi primer 1(sense) <400>	3 tacagttacg gtcttgcct cccctga
27 <210> 4 <211> 21 <212>	DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
L. starkeyi primer 2(antisense) <400>	4 ctctacatgg agcagattcc a